D.R.

1 *Daniel Bradley.*

Histoire des hépatites

4. Le miracle de la biologie moléculaire : la découverte des virus des hépatites C et E

Jean-Louis PAYEN
Michel RONGIÈRES
Services d'hépato-gastro-entérologie et d'orthopédie
Hôpital Purpan
31059 Toulouse Cedex
PAYEN.JL@chu-toulouse.fr

Malgré la découverte des agents des hépatites A, B et delta, une véritable épidémie d'hépatites se développa au cours des 5 dernières décennies. Aucun des marqueurs viraux ne permettait de détecter l'agent responsable de cette maladie, d'où sa dénomination jusqu'en 1989 d'hépatite non A-non B. Son expansion fut liée en grande partie au développement de la transfusion sanguine, mais aussi à celui des gestes invasifs et de la toxicomanie par voie intraveineuse, autre mode de contamination pouvant expliquer cette épidémie du XX^e s.[1] Le dernier article de notre série sur l'histoire des hépatites virales retrace l'extraordinaire aventure scientifique que fut la découverte de l'agent des hépatites non A-non B. Traqué pendant 10 ans, les techniques de biologie moléculaire qui contribuèrent à sa découverte ont ouvert une nouvelle voie aboutissant à la mise en évidence de nombreux autres virus.

Les besoins en produits sanguins labiles pour la population française sont importants ; on estime que 4,2 millions d'unités de sang sont annuellement nécessaires pour les couvrir (chiffre de 1992). Le développement de la transfusion est un des facteurs importants de l'augmentation de l'espérance de vie constatée ces dernières décennies. Elle ouvre la voie des thérapeutiques agressives mais très efficaces comme les chimiothérapies, les greffes de moelle osseuse, les transplantations. Cependant, la transfusion transmet certaines maladies. Avant 1989, année de la découverte du virus C, 7 à 12 % des malades transfusés développaient une hépatite post-transfusionnelle.[2] Aujourd'hui, dans les pays développés, lorsqu'une étude transversale est réalisée chez les malades infectés par le virus de l'hépatite C, environ un tiers d'entre eux ont eu une transfusion sanguine. D'autres connaissances scientifiques renforcent encore l'idée du rôle majeur joué par la transfusion sanguine dans l'épidémie d'hépatite C. Ainsi, la plupart des malades contaminés par la transfusion sanguine ont le même génotype viral (1b).[3]

Le concept d'hépatite non A-non B

Dès 1975, soit 2 ans après la découverte du virus de l'hépatite A, Stephen Feinstone *et al.* publièrent un article posant la première pierre d'un concept nouveau : celui d'hépatite non A-non B.[4] Vingt-deux malades présentaient une hépatite post-transfusionnelle et les recherches sérologiques permettaient d'éliminer une infection par les virus A et B ou par le cytomégalovirus et le virus Epstein-Barr, potentiellement responsables eux aussi d'hépatite.[5] À cette époque, il était devenu clair que les hépatites post-transfusionnelles, anciennement « hépatites sériques », avaient soit une incubation longue, et dans ce cas elles étaient liées au virus de l'hépatite B, soit une incubation courte (4 semaines environ).[6,7] Cette période d'incubation semblait bien trop courte pour être liée au virus B. Quelques cas étaient rapportés au Costa Rica[8] et en Australie.[9] D'autres équipes américaines, notamment celles d'A.M. Prince, [10] et d'H.J. Alter constatèrent aussi le phénomène.[11] De nombreuses études se développèrent alors sur ce « nouveau » type d'hépatite dont l'agent restait inconnu. Une étude publiée en 1977 portait sur des sérums étudiés provenant de sujets volontaires contaminés dans les années

1950 par du sérum provenant lui-même de malades atteints d'hépatite non A-non B post-transfusionnelle, prélevés 6 à 12 mois après les premiers symptômes de leur maladie.[12] Sur 9 sujets ainsi contaminés, 6 développèrent une jaunisse entre le 18e et le 89e j et 2 une hépatite chronique. La maladie passait donc fréquemment à la chronicité. Il était par ailleurs observé que son mode de contamination était majoritairement la transfusion sanguine.[13] Dans les années 1970, 7 à 12 % des sujets transfusés développaient une hépatite post-transfusionnelle de type non A-non B.[2] Dienstag rapportait aussi des contaminations par des instruments médicaux et chirurgicaux, contamination dite nosocomiale.[2] Dans la plupart des cas, cette hépatite ne provoquait que peu ou pas de symptômes. Cependant la progression de l'hépatite chronique vers une cirrhose était constatée chez environ 20 % des malades.[2] Un lien avec le développement de carcinome hépatocellulaire était aussi noté.[14] Comme pour les autres agents infectieux responsables des hépatites virales, les modèles animaux furent difficiles à trouver. Toutefois, en 1985, Daniel Bradley *et al.* (fig. 1) infectèrent un chimpanzé avec l'agent responsable des hépatites non A-non B.[15] Ce modèle animal allait permettre de mieux approcher le responsable de cette maladie. Différentes équipes échouèrent dans leurs tentatives de mise au point de tests diagnostiques.[2] Pourtant, la maladie inquiétait par son développement et ses liens prononcés avec la transfusion sanguine.[16] Une collaboration étroite entre l'équipe de chercheurs de Chiron-Corporation (Emeryville, Californie), dirigée par Michael Houghton (fig. 2) et celle de Daniel Bradley (*Centers for Disease Control*, Atlanta, Georgia), permit la découverte de l'agent viral de la grande majorité des hépatites non A-non B. Il fallut attendre 15 ans après l'individualisation de la maladie par Feinstone *et al.* Le long délai s'explique par la technique qu'il fallut mettre au point pour découvrir le génome du virus. Il s'agit d'une véritable révolution dans le domaine de la virologie. La même technique a permis aussi de détecter d'autres agents viraux tels que le virus de l'hépatite G [17-19] ou le TTV (*transfusion transmitted virus*) [20-23], virus infectant les humains, mais dont la signification pathologique reste à démontrer.

D.R.

2 ***Michael Houghton.***

Découverte du virus de l'hépatite C

Qui-Lim Choo et George Kuo (fig. 3 et 4), de l'équipe de Houghton, ont employé une méthode nouvelle pour s'attaquer à la découverte du virus de l'hépatite non A-non B, bientôt appelé virus de l'hépatite C.[24] En utilisant le modèle animal mis au point par Bradley, les chercheurs de la *Chiron Corporation* ont développé une technique relativement simple, mais extrêmement laborieuse. Elle repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, enzyme capable de synthétiser un brin complémentaire d'acide désoxyribonucléique à partir d'un brin initial à amplifier. Sa mise au point et le principe de son utilisation potentielle en recherche furent publiés en 1985 ; elles valurent à son inventeur K.B. Mullis, le prix Nobel de chimie en 1993.[25] Qui-Lim Choo entreprit d'abord d'extraire du sang de l'animal infecté, tous les acides ribo- et désoxyribonucléiques possibles, puis il incorpora tous ces fragments de code génétique, un par un, dans un bactériophage (γ-GT 11) qui, à partir du brin d'acide nucléique incorporé, a synthétisé une protéine correspondante. L'équipe put alors tester chaque protéine produite (considérée comme l'antigène) contre le sérum de malades atteints d'une hépatite non A-non B, contenant donc probablement

D.R.

3 ***Qui-Lim Choo.***

des anticorps spécifiques. Après avoir testé environ un million de protéines produites par le bactériophage, l'une d'elles, provenant d'un clone d'ADN 5-1-1, allait réagir avec les anticorps des malades. Afin de s'assurer de son origine virale, Choo *et al.* utilisèrent le clone ayant produit la protéine réactive (clone d'ADN 5-1-1) et tentèrent de l'hybrider avec des brins d'ADN provenant d'un singe ou d'un homme sain, sans succès. Puis, ils testèrent les ADN retrouvés dans le foie d'un singe infecté par l'agent de l'hépatite non A-non B : une hybridation se produisit. Une fois le code génétique du virus déterminé, il suffisait de produire la structure protéique correspondante et de la tester contre les anticorps de malades : 7 sérums sur 10, provenant de malades atteints d'hépatite non A-non B réagirent positivement, alors qu'aucun sérum de sujet non contaminé par le virus ne manifesta de réaction.[24] Rapidement furent mis au point des tests sérologiques, et des études furent publiées dès 1989 sur les malades développant des hépatites post-transfusionnelles.[26]

Découverte du virus de l'hépatite E

En octobre 1955, saison des pluies sur une partie de l'Inde, le ciel se déchaîna au-dessus de Wazirabad, banlieue de New Delhi où se trouvait une station de pompage pour alimenter en eau potable un million d'habitants. Les pluies diluviennes firent déborder un

D.R.

4 *George Kuo.*

égout à l'air libre près de la station de pompage, ce qui la pollua. Or, entre décembre 1955 et janvier 1956, 29 300 habitants de la région développèrent une hépatite aiguë.[27] Cette épidémie très importante par le nombre de patients atteints donna lieu à de nombreuses observations. La maladie, ressemblant beaucoup à l'hépatite épidémique (hépatite A), était le plus souvent bénigne. Cependant elle semblait plus dangereuse chez les femmes enceintes, notamment au cours du 3e trimestre de la grossesse avec des cas d'hépatite fulminante.[28] La maladie n'évoluait pas vers la chronicité.[29] À l'époque, il fut conclu qu'il s'agissait d'une importante épidémie d'hépatite probablement liée au virus de l'hépatite A (VHA). Cependant, quand les premiers tests diagnostiques furent disponibles pour détecter un contact même ancien avec le VHA, il s'avéra que dans les pays en voie de développement la prévalence de ces anticorps (immunoglobulines anti-HA de type IgG) était très élevée, y compris chez les sujets jeunes, et que ces anticorps étaient protecteurs contre une nouvelle infection par le même virus. Il devenait donc peu probable que près de 30 000 habitants de New Delhi eussent pu être contaminés par le VHA.[9]

Jules Dienstag, alors jeune collaborateur de Robert Purcell aux NIH, partit en Inde à la recherche de sérums encore disponibles concernant cette épidémie d'hépatite, mais sa quête fut vaine. Cependant, après son retour aux États-Unis, un sérum qu'il convoitait, stocké en Inde depuis 1956, fut découvert dans le laboratoire de Korshed Pavri, directeur de l'Institut national de virologie de Pune. Son équipe s'était en effet intéressée à l'épidémie d'hépatite en 1955-56. L'échantillon fut alors adressé au laboratoire de Robert Purcell. Les analyses réalisées par Doris Wong indiquèrent clairement qu'il ne s'agissait pas d'une hépatite à virus A.[30] Wong confirma par contre la transmission féco-orale de la maladie.[31] D'autres auteurs publièrent des cas de petites épidémies ressemblant fortement à celle de New Dehli. Un jeune gastro-entérologue, Mohammed Sultan Khuroo qui travaillait au Cachemire rapporta quelques cas en 1983.[32] Au cours de la même année, un Russe, Mikhail Balayan, de l'Institut de la poliomyélite et des encéphalites virales de Moscou, rapporta son expérience consistant en l'ingestion des selles mises en suspension, provenant d'un patient ayant présenté une hépatite de type épidémique non-A, à Tashkent en Asie centrale. Après cela il développa une hépatite aiguë et utilisa ses propres selles pour rechercher les virus en microscopie électronique. Une particule pouvant correspondre à un virus de 27-32 nm fut mise en évidence.[33] Un modèle animal fut alors développé avec transmission de l'agent infectieux à un singe de type marmouset,[34] ainsi que chez d'autres primates, notamment le chimpanzé.[35] En 1989, l'équipe de Daniel Bradley, qui avait développé le modèle animal d'infection du virus non A-non B chez le macaque aux CDC d'Atlanta, publiait la découverte de l'agent viral responsable des hépatites non A-non B de type entérique.[36] Ainsi, le 5e virus responsable d'hépatite virale était identifiable dans le sérum des malades : il fut nommé virus de l'hépatite E (VHE).[9]

Épilogue

L'histoire des hépatites couvre 5 millénaires : une goutte d'eau dans la longue marche de la vie, mais une histoire déjà si riche ; histoire marquée par l'observation des Anciens d'abord, puis par l'extraordinaire développement des techniques de biologie au cours du XXe s. Aujourd'hui, nous sommes capables de découvrir des virus comme le virus de l'hépatite G (GBV-C) ou le TTV qui infectent l'espèce humaine, mais au vu des connaissances actuelles, sans entraîner de maladie spécifique. Le virus de l'hépatite G jouerait même un rôle protecteur chez les malades co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine. En 1993, Robert Purcell parlait de l'âge d'or de la recherche sur les hépatites,[9] mais s'il est vrai que nous possédons maintenant des outils diagnostiques pour préciser l'agent responsable de la plupart de nos vieilles jaunisses, cependant il nous faut reconnaître que nous sortons tout juste de l'âge de pierre dans le domaine thérapeutique. En outre, des agents infectieux responsables d'hépatites (hépatite non-A à E) nous échappent encore. Si les pays développés, notamment grâce à la vaccination contre l'hépatite B, qui protège contre les virus B et delta, sont peu touchés par ces derniers, il n'en est pas de même dans le reste du monde, et nous comptons pas moins de 300 millions de sujets porteurs du virus B sur notre planète. Les recherches avancent dans le traitement de l'hépatite C, mais seuls environ 50 % des malades traités sont actuellement guéris. Espérons que dans un avenir proche, on pourra parler des hépatites virales comme on parle aujourd'hui de la variole : « il était une fois une jaunisse infectieuse qui a disparu de la terre. » ■

Remerciements

André et Nady Gil Artagnan, Baruch Samuel Blumberg, Claudine Colleu, Y. Fares, Jacques Izopet, Catherine Payen, Stephen Feinstone, Mario Rizzetto, Pierre Jammey, Jacques Frexinos, M. Pillière nous ont aidé de leurs nombreux conseils pour la rédaction de cette série de 4 articles.

Pour en savoir plus

Payen JL. De la jaunisse à l'hépatite C. 5 000 ans d'histoire. EDK : Paris, 2002.

Histoire des hépatites

De la jaunisse des Sumériens à la découverte des hépatites alphabétiques

Déjà paru :

1. De la jaunisse au virus. Rev Prat 2002 ; 52 : 2097-100.
2. Individualisation de l'hépatite épidémique et grandes hypothèses pathogéniques. Rev Prat 2002 ; 52 : 2213-7.
3. L'ère des antigènes et de la microscopie électronique. Rev Prat 2003 ; 53 : 7-10.

RÉFÉRENCES

1. Alter M. Transmission of hepatitis C virus-route, dose, and titer. N Engl J Med 1994; 330: 784-6.
2. Dienstag J. Hepatitis non-A, non-B: C at last. Gastroenterology 1990; 99: 1177-80.
3. Pawlotsky J, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F *et al.* Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. J Infect Dis 1995; 171: 1607-10.
4. Feinstone S, Kapikian A, Purcell R, Alter H, Holland P. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N Engl J Med 1975; 292: 767-70.
5. Stern H. Cytomegalovirus and EB virus infections of the liver. Br Med Bull 1972; 28: 180-5.
6. Tavakkol A. Étude de la situation de la question de l'ictère par inoculation post-transfusionnelle au centre de transfusion sanguine de Genève. Genève: Université de Genève; 1960.
7. Ferraris J. Contribution à l'étude des hépatites transfusionnelles ictériques et anictériques en chirurgie cardio-vasculaire. Paris, thèse Faculté de médecine; 1966.
8. Villajeros VM, Visona KA, Eduarte CA Provost PJ, Hilleman MR. Evidence for viral hepatitis other than type A or type B among persons in Costa Rica. N Engl J Med 1975; 293: 1350-2.
9. Purcell R. The discovery of the hepatitis viruses. Gastroenterology 1993; 104: 955-63.
10. Prince A, Brotman B, Grady G *et al.* Long incubation post transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. Lancet 1974; 2: 241-6.
11. Alter H, Holland P, Purcell R *et al.* Post-transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. Ann Intern Med 1972; 77: 691-9.
12. Hoofnagle J, Gerety R, Tabor E, Feinstone SM, Barker LF, Purcell RH. Transmission of non A-non B hepatitis. Ann Intern Med 1977; 87: 14-20.
13. Knodell R, Conrad M, Ishak K. Development of chronic liver disease after acute non A-non B post transfusion hepatitis. Role of gamma-globulin. Gastroenterology 1977; 72: 902-9.
14. Dienstag J, Alter H. Non-A, Non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. Sem Liver Dis 1986; 6: 67-81.
15. Bradley D, McCaustland K, Cook E, Shable C, Ebert J, Maynard J. Posttransfusion non A-non B hepatitis in chimpanzees: physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. Gastroenterology 1985; 88: 773-9.
16. Hay C, Preston F, Triger D, Underwood J. Progressive liver disease in haemophilia: an understated problem? Lancet 1985; 1: 1495-8.
17. Fattovich G, Ribero ML, Favarato S *et al.* Influence of GB virus-C/hepatitis G virus infection on the long-term course of chronic hepatitis B. Liver 1998; 18: 360-5.
18. Xiang J, Klinzman D, McLinden J *et al.* Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. J Virol 1998; 72: 2738-44.
19. Karayiannis P, Pickering J, Zampino R, Thomas H. Natural history and molecular biology of hepatitis G virus/GB virus C. Clin Diagn Virol 1998; 10: 103-11.
20. Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. J Med Virol 1999; 57: 252-8.
21. Simmonds P, Davidson F, Lycett C *et al.* Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products [see comments]. Lancet 1998; 352: 191-5.
22. Naoumov N, Petrova E, Thomas M, Williams R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. Lancet 1998; 352: 195-7.
23. Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P *et al.* Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. J Med Virol 1998; 56: 234-8.
24. Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244: 359-62.
25. Saiki R, Sharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-4.
26. Alter H, Purcell R, Shih J *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non A-non B hepatitis. N Engl J Med 1989; 321: 1494-500.
27. Viewanath R. Epidemiology: infectious hepatitis in Delhi 1955-56. Indian J Med Res 1957; 45 (Suppl. 1): 1-29.
28. Naidu S, Viewanath R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56: a critical study observations in pregnant women. Indian J Med Res 1957; 45: 71-6.
29. Chuttani H, Sidhu A, Wig K *et al.* Follow up of the cases from the Delhi epidemic of infectious hepatitis of 1955-56. BMJ 1966; ii: 676-9.
30. Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for non A-non B hepatitis virus aetiology. Lancet 1980; 2: 876-9.
31. Sheron N, Alexander G. Hepatitis C, D and E virus infection. In: Virus infection of the gut and liver. London: Baillères's Clinical Gastroenterology; 1990 : 749-74.
32. Khuroo M, Deurmeyer W, Zargar S Ahanger MA, Shah MA. Acute sporadic non A-non B hepatitis in India. Am J Epidemiol 1983; 118: 360-4.
33. Balayan M, Andajaparidze A, Savinskaya S *et al.* Evidence for a virus in non A-non B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology 1983; 20 : 23-31.
34. Kane M, Bradley D, Shresta S *et al.* Epidemic non A-non B hepatitis in Nepal. Recovery of possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. JAMA 1984; 252: 3140-5.
35. Abe K, Shikata T, Fujisawa K *et al.* Transmission of non A-non B hepatitis agent to chimpanzees from patients of epidemic hepatitis. Jpn J Med Sci Biol 1986; 39: 119-27.
36. Krawczynski K, Bradley D. Enterically transmitted non A-non B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. J Infect Dis 1989; 159: 1042-9.

Abonnez-vous ou réabonnez-vous en ligne* à La Revue du Praticien

sur son site Internet **www.33docpro.com**

* *Paiement par carte bancaire* « secteur bancaire sécurisé »